

# تغییرات غلظت پلاسمایی هورمونهای تیروئیدی در گوسفندان تحت محدودیت انرژی و اثر تزریق وریدی لپتین بر آن

آرمین توحیدی<sup>۱\*</sup>، همایون خزعلی<sup>۲</sup>، امیر نیاسری<sup>۳</sup>، مهدی ژندی<sup>۴</sup>

دریافت مقاله: ۶ خردادماه ۱۳۸۵  
پذیرش نهایی: ۲۲ شهریورماه ۱۳۸۵

## CHANGES IN THE PLASMA CONCENTRATIONS OF THYROID HORMONES IN ENERGY RESTRICTED EWES AND THE EFFECT OF INTRAVENOUS INJECTION OF LEPTIN ON THEIR LEVELS

Towhidi, A.<sup>1\*</sup>, Khazali, H.<sup>2</sup>, Niasari Naslaji, A.<sup>3</sup>, Zhandi, M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Sciences, Faculty of Agronomy and Animal Sciences, University of Tehran, Karaj-Iran. <sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Shaheed Beheshti, Tehran-Iran. <sup>3</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. <sup>4</sup>Graduated from the Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran.

The aim of this study was to determine changes in the concentration of leptin and thyroid hormone in energy restricted ewes and effect of leptin injection on thyroid hormone level. In the first experiment, 28 ewes were assigned to two groups (n=14). Ewes were fed by a ration that provided 60% or 100% of maintenance energy requirements during 71 days. Blood samples were collected and body weight (BW) and body condition score (BCS) were determined. In the second experiment, 6 energy-restricted ewes from the first experiment were selected and assigned to two groups (n=3). Ewes were fed a ration that provided 60% of maintenance energy requirements and injected by 1 or 4 µg leptin/Kg BW. Blood samples were taken and BW and BCS were determined. In the first experiment, concentrations of leptin, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>, BW and BCS were decreased in energy restricted ewes (p<0.01). In the second experiment, concentration of T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> and leptin were increased by leptin injection (p<0.01). The results suggested leptin injection may restore thyroid hormone secretion to normal levels in energy-restricted ewes. *J. Vet. Res.* 62,1:15-20,2007.

**Key words:** leptin, thyroid hormones, energy-restriction, ewe.

\*Corresponding author's email: atowhidi@ut.ac.ir, Tel: 0261-2248082, Fax: 0261-2226752

کاهش ساخت پیش مولکول TRH (۱۶) (جولوگیری به عمل آورده است (۲). همچنین شواهدی در دست است که نشان می دهد، لپتین باعث افزایش آزادسازی هورمونهای TSH و T<sub>4</sub> می شود (۹)؛ اما تاکنون گزارشی از اثر احتمالی لپتین بر ترشح هورمونهای تیروئیدی در نشخوارکنندگان از جمله گوسفند منتشر نشده است.

با توجه به مطالب فوق، هدف از آزمایش حاضر، مطالعه اثر محدودیت

هدف مطالعه حاضر، تعیین تغییرات غلظت هورمونهای لپتین و تیروئیدی در میش های تحت محدودیت انرژی و اثر تزریق لپتین بر ترشح غده تیروئید پس از کاهش سطح هورمونها در اثر محدودیت انرژی بود. در آزمایش اول، ۲۸ رأس میش به دو گروه چهارده رأسی تقسیم و ۷۱ روز از جیره حاوی ۶۰ درصد یا ۱۰۰ درصد انرژی نگهداری تغذیه شدند. نمونه های خون اخذ و وزن و امتیاز وضعیت بدن تعیین گردید. در آزمایش دوم، ۶ رأس میش تحت محدودیت انرژی از آزمایش اول انتخاب و به دو گروه سه رأسی تقسیم و ضمن تغذیه در حد ۶۰ درصد انرژی نگهداری به ترتیب ۱ یا ۴ µg BW/kg لپتین دریافت نمودند. نمونه های خون اخذ و وزن و امتیاز وضعیت بدن تعیین شد. در آزمایش اول، غلظت هورمونهای تیروئیدی و لپتین، وزن و امتیاز وضعیت بدن در گروه تحت محدودیت انرژی کاهش یافت. در آزمایش دوم، تزریق لپتین، موجب افزایش غلظت T<sub>3</sub> و T<sub>4</sub> و لپتین شد. نتایج نشان داد که لپتین قادر به تقلیل اثر کاهنده محدودیت انرژی بر ترشح هورمونهای تیروئیدی در میش است. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۱، ۱۵-۲۰.

واژه های کلیدی: لپتین، هورمونهای تیروئیدی، محدودیت انرژی، میش.

هورمونهای تیروکسین (T<sub>4</sub>) و تری یدوتیرونین (T<sub>3</sub>) در متابولیسم انرژی نقش اساسی داشته و سطح آنها در خون، میزان متابولیسم پایه را در بدن تعیین می کند. مطالعات پیشین نشان داده اند، تغییرات غلظت هورمونهای تیروئیدی در خون در ارتباط مستقیم با سطح خوراک مصرفی است (۳۰، ۷، ۸، ۱۷). در نشخوارکنندگان، کاهش سطح خوراک مصرفی موجب کاهش ترشح و غلظت پلاسمایی T<sub>3</sub> و T<sub>4</sub> شده است (۷، ۲۵). در اسبهای نابالغ و بالغ با محدودیت غذایی کوتاه مدت، هورمون T<sub>3</sub> کاهش و با افزایش سطح تغذیه بلافاصله افزایش یافته است (۸، ۱۸). در یک آزمایش دیگر، محدودیت غذایی طولانی مدت در کره اسب نیز موجب کاهش سطح T<sub>3</sub> شد (۱۲).

از سوی دیگر در سالهای اخیر مشخص شده است که هورمون لپتین نقش مهمی در افزایش متابولیسم پایه و ترموژنز (۱۹، ۱۵، ۱۴، ۵) و لیپولیز (۱۱، ۱۴) در پستانداران دارد. با توجه به نقش یکسان هورمونهای تیروئیدی و لپتین در فرایندهای ذکر شده، مطالعاتی در خصوص نحوه ارتباط بین این دو هورمون انجام شده است. تزریق هورمون لپتین به داخل بطن سوم مغز (ICV) در موشهای گرسنه، از کاهش سطح هورمونهای T<sub>3</sub> و T<sub>4</sub> و

۱) گروه علوم دامی، دانشکده علوم زراعی و دامی، دانشگاه تهران، کرج-ایران.

۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی، تهران-ایران.

۳) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران-ایران.

۴) دانش آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران-ایران.

\* نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۶۱-۲۲۴۸۰۸۲، فاکس: ۰۲۶۱-۲۲۴۶۷۵۲

Email: atowhidi@ut.ac.ir



جدول ۱- اجزای جیره‌های آزمایشی برحسب ماده خشک، مقدار انرژی و مواد مغذی مصرفی.

شماره جیره		شماره جیره	
۱	۲	۱	۲
۴۲/۰۰	۱۳/۷۲	پروتئین خام (%)	۲۶۰
۰/۵۲	۰/۲۴	کلسیم (%)	۵۰
۰/۵۲	۰/۲۴	فسفر (%)	۲۲۰
۰/۴۵	۰/۲۱	سدیم (%)	۸۵
۰/۲۴	۰/۱۱	منیزیم (%)	۰/۴۷
۲۸۷	۶۲۰	ماده خشک مصرفی (گرم در روز)	۱/۲۲
۳/۷۴	۶/۰۳	انرژی متابولیسمی مصرفی (مگاژول در روز)	--
۵۶/۰۰	۵۵/۳۷	پروتئین متابولیسمی مصرفی (گرم در روز)	۳/۵۰
		انرژی متابولیسمی (مگاژول در کیلوگرم)	۱۳/۰۳
			۹/۷۳

۱- جیره حاوی ۶۰ درصد انرژی متابولیسمی و سایر احتیاجات در حد نگهداری.

۲- جیره حاوی ۱۰۰ درصد انرژی متابولیسمی و سایر احتیاجات در حد نگهداری.

دریافت کردند. نمونه‌های خون در روزهای صفر و پنج، نیم ساعت پیش از خوراک دهی و در روزهای دو و چهار، نیم ساعت قبل و بعد از تزریق لپتین، از کلیه میش‌ها جمع‌آوری گردید. همچنین، وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن یک روز قبل (روز صفر) و یک روز بعد از دوره تیمار (روز پنج) تعیین شد.

تغذیه: ترکیبات شیمیایی خوراکی شامل ماده خشک، انرژی خام، پروتئین خام، چربی خام، خاکستر کل، دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز، کلسیم و فسفر در آزمایشگاه تغذیه مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور تعیین شد. جیره‌های غذایی مورد استفاده در این مطالعه براساس AFRC (۱۹۹۵) (۱) تنظیم گردید (جدول ۱). خوراک روزانه به صورت حبه شده هر روز صبح پس از توزین دقیق بر مبنای وزن بدن و به صورت انفرادی در ساعت ۸ صبح در اختیار دامها قرار گرفت. در طی دوره آزمایش، گوسفندان به آب تازه، سنگ نمک و آجر لیسیدنی معدنی (کلسیویت، شرکت کانی دام ایران) به طور آزاد دسترسی داشتند.

روش خونگیری: خونگیری با استفاده از لوله‌های تحت خلاء حاوی هپارین و از طریق ورید وداج صورت گرفت. در آزمایش نخست، نمونه‌های خون به میزان ۱۰ میلی لیتر از چهار حیوان در هر گروه در روزهای ۱، ۱۵، ۲۹، ۴۳، ۵۷ و ۷۱ و پیش از خوراک دهی، جمع‌آوری گردید.

در آزمایش دوم، در صورت آن که روز آغاز تیمار با لپتین را روز یک فرض کنیم، نمونه‌های خون در ساعت هشت روز صفر (یک روز قبل از آغاز تزریقات)، در ساعت هشت (قبل از تزریق لپتین) و نه (بعد از تزریق لپتین) روزهای دوم و چهارم، و در ساعت هشت روز پنج (یک روز بعد از پایان تزریقات لپتین) جمع‌آوری شد. نمونه‌های حاصله به مدت بیست دقیقه در ۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و پلاسما حاصله در داخل لوله‌های پلاستیکی تا زمان سنجش هورمون هادرمای ۲۰- درجه سانتیگراد در فریزر نگهداری شد.

اندازه‌گیری هورمون‌ها: غلظت هورمونهای تیروئیدی و لپتین با

انرژی بر سطح هورمونهای تیروئیدی و لپتین در خون میش و تأثیر تزریق وریدی لپتین در دو سطح یک و چهار میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ( $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ ) بر روی غلظت پلاسمایی هورمونهای  $T_3$  و  $T_4$  در میش‌هایی بود که با محدودیت انرژی مواجه بودند.

## مواد و روش کار

مکان و زمان آزمایش: آزمایش حاضر در پائیز سال ۱۳۷۹ در مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور واقع در شهرستان کرج با طول جغرافیایی  $51^{\circ}2'$  شرقی و عرض جغرافیایی  $48^{\circ}35'$  شمالی اجرا گردید. حیوانات در طول دوره آزمایش در قفسهای انفرادی و در جایگاه بسته نگهداری شدند.

حیوانات: در آزمایش اول، بیست و هشت رأس میش شال با میانگین وزن  $2/35 \pm 0/16$  کیلوگرم و امتیاز وضعیت بدن  $0/41 \pm 0/93$  انتخاب شده و به مدت هفتاد و یک روز در دو گروه چهارده رأسی تحت محدودیت انرژی یاد در سطح نگهداری قرار گرفتند. در آزمایش دوم، از میان چهارده رأس میشی که تحت محدودیت غذایی قرار داشتند، تعداد شش رأس انتخاب شدند. میش‌ها پس از دوره محدودیت غذایی دارای میانگین وزن  $0/76 \pm 0/78$  کیلوگرم و امتیاز وضعیت بدن  $0/00 \pm 0/00$  بودند.

طرح آزمایش: در آزمایش اول، پس از طی دوره عادت دهی، میش‌ها به طور تصادفی به دو گروه مساوی ۱۴ رأسی تقسیم شده و در طی شش دوره فعلی به مدت هفتاد و یک روز تحت تیمار قرار گرفتند. گروه اول به عنوان تیمار از جیره‌ای حاوی ۶۰ درصد انرژی متابولیسمی نگهداری و گروه دوم به عنوان شاهد با استفاده از جیره‌ای حاوی ۱۰۰ درصد انرژی متابولیسمی نگهداری (AFRC, 1995)، تغذیه شدند. در صورتی که روز شروع تیمار غذایی را روز اول آزمایش در نظر بگیریم، جهت همزمان کردن فعلی از هفت تزریق متوالی پروستاگلاندین  $F_{2\alpha}$  (کلوپرستنول، شرکت نصر، ایران) به میزان ۲۵۰ میکروگرم به ازای هر میش در روزهای ۱۱-، ۰، ۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶ و ۷۰ استفاده شد. در کلیه میش‌ها، وزن و امتیاز وضعیت بدن به روش لمس ناحیه پشتی مهره سیزدهم کمری (بر مبنای سیستم صفر تا پنج) هر دو هفته یک بار در روزهای ۱-، ۱۳، ۲۷، ۴۱، ۵۵ و ۶۹ قبل از شروع چرخه فعلی جدید تعیین شد. لازم به ذکر است که چرخه فعلی در انتهای آزمایش اول در گروه تحت محدودیت انرژی متوقف شد. این امر توسط فعلل یابی بوسیله قوچ‌های تیزر مشخص گردید. نمونه‌های خون از چهار حیوان به صورت ثابت در هر گروه در روزهای ۱، ۱۵، ۲۹، ۴۳، ۵۷ و ۷۱ اخذ شد.

در آزمایش دوم و یک روز پیش از شروع تزریق لپتین، از بین میش‌های آسیکلیک تحت محدودیت انرژی آزمایش اول (یک هفته بعد از آزمایش نخست)، ۶ رأس میش انتخاب و به طور تصادفی به دو گروه سه رأسی تقسیم شده و از روز اول به مدت چهار روز، تیمارهای زیر را دریافت کردند. گروه‌های اول و دوم با استفاده از جیره‌ای حاوی ۶۰ درصد انرژی متابولیسمی نگهداری تغذیه شده و به علاوه روزانه به ترتیب مقدار  $1 \mu\text{g}/\text{kgBW}$  و  $4 \mu\text{g}/\text{kgBW}$  لپتین نوترکیب انسانی (Mediagnost Ltd., Germany) به صورت وریدی



آزمایش به تدریج کاهش یافت. در گروه شاهد، تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف مشاهده نشد (جدول ۱).

سطح انرژی مصرفی، زمان و اثر متقابل آنها دارای اثر معنی دار ( $p < 0/01$ ) بر سطح هورمون لپتین پلازما بود. به طوری که در گروه تیمار غلظت هورمون لپتین پلازما از روز ۲۹ تا انتهای آزمایش به تدریج کاهش یافت. در گروه شاهد، تفاوت معنی دار در زمانهای مختلف مشاهده نشد (جدول ۱).

سطح انرژی مصرفی، زمان و اثر متقابل آنها دارای اثر معنی دار ( $p < 0/01$ ) بر سطح هورمون  $T_4$  پلازما بود. میانگین غلظت هورمون  $T_4$  پلازما در گروه تیمار (گروهی که در سطح ۶۰ درصد انرژی نگهداری تغذیه شدند) با گذشت زمان کاهش یافت، به طوری که این میانگین در روزهای ۴۳، ۵۷، ۷۱ نسبت به زمانهای قبل و گروه شاهد (گروهی که در سطح ۱۰۰ درصد انرژی نگهداری تغذیه شدند) پایین تر بود (جدول ۱).

سطح انرژی مصرفی، زمان و اثر متقابل آنها دارای اثر معنی دار ( $p < 0/01$ ) بر سطح هورمون  $T_3$  پلازما بود. در گروه تیمار، میانگین غلظت هورمون  $T_3$  در گروه تیمار در طی زمان کاهش یافت، به طوری که این میانگین در روزهای ۴۳ و ۵۷ نسبت به زمانهای قبل و گروه شاهد پایین تر بود. در روز ۷۱ مجدداً میانگین غلظت هورمون  $T_3$  نسبت به زمانهای قبل و گروه شاهد تقلیل یافت (جدول ۱).

ضریب همبستگی بین غلظت پلاسمایی هورمونهای  $T_3$  و  $T_4$  با وزن بدن، به ترتیب  $+0/57$  ( $p < 0/001$ ) و  $+0/46$  ( $p < 0/05$ )، با امتیاز وضعیت بدن، به ترتیب  $+0/69$  ( $p < 0/001$ ) و  $+0/55$  ( $p < 0/01$ ) و با غلظت لپتین، به ترتیب  $+0/65$  ( $p < 0/001$ ) و  $+0/67$  ( $p < 0/001$ ) بود.

آزمایش دوم: تیمار ( $p < 0/01$ )، زمان ( $p < 0/01$ ) و اثر متقابل آنها ( $p < 0/01$ ) دارای اثر معنی دار بر سطح هورمون لپتین پلازما بود. در هر دو گروه، میانگین غلظت هورمون لپتین پلازما در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق لپتین به طور معنی دار نسبت به زمانهای قبل از تزریق مربوطه و یک روز پس از آخرین تزریق (روز پنجم) بالاتر بود. میانگین غلظت این هورمون در گروهی که  $4 \mu\text{g/kg BW}$  به جای  $1 \mu\text{g/kg BW}$  لپتین دریافت کرده، در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق به طور معنی داری ( $p < 0/01$ ) بیشتر از گروه دیگر بود (جدول ۲).

تیمار ( $p < 0/01$ )، زمان ( $p < 0/01$ ) و اثر متقابل آنها ( $p < 0/01$ ) دارای اثر معنی دار بر سطح هورمون  $T_4$  پلازما بود. در هر دو گروه، میانگین غلظت هورمون  $T_4$  پلازما در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق لپتین به طور معنی دار نسبت به زمانهای قبل از تزریق مربوطه و یک روز پس از آخرین تزریق (روز پنجم) بالاتر بود. میانگین غلظت این هورمون در گروهی که  $4 \mu\text{g/kg BW}$  به جای  $1 \mu\text{g/kg BW}$  لپتین دریافت کرده، در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق به طور معنی داری ( $p < 0/01$ ) بیشتر از گروه دیگر بود (جدول ۲).

تیمار ( $p < 0/01$ )، زمان ( $p < 0/01$ ) و اثر متقابل آنها ( $p < 0/01$ ) دارای اثر معنی دار بر سطح هورمون  $T_3$  پلازما بود. در هر دو گروه، میانگین غلظت

آنتی بادی گوسفندی (شرکت تابشیر نور، تهران، ایران) در نمونه‌های پلازما به روش رادیوایمونواسی و با دو تکرار برای هر نمونه اندازه‌گیری شد. حساسیت روش به کاررفته برای اندازه‌گیری غلظت هورمونهای لپتین،  $T_3$  و  $T_4$  به ترتیب معادل  $0/1 \text{ ng/ml}$ ،  $0/05 \text{ ng/ml}$  و  $1 \text{ ng/ml}$  بود. ضریب تغییرات داخل سنجش برای اندازه‌گیری غلظت هورمونهای لپتین،  $T_3$  و  $T_4$  به ترتیب معادل  $6/3\%$ ،  $2/3\%$  و  $4/7\%$  درصد بود. ضریب تغییرات بین سنجش برای اندازه‌گیری غلظت هورمونهای لپتین،  $T_3$  و  $T_4$  به ترتیب معادل  $9/3\%$ ،  $6/9\%$  و  $5/3\%$  درصد بود.

برای سنجش هورمونهای مختلف از روش‌های زیر استفاده شد:

**الف) لپتین:** ۱۰۰ میکرولیتر نمونه پلازما به داخل لوله‌های پوشش دار شده با آنتی بادی اضافه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر ترپسر به کلیه لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها بخوبی به هم زده شده و پس از ۱۵ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، ۵۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده به آنها افزوده گردید. بعد از مخلوط کردن محتویات، لوله‌ها در دمای ۲ تا ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت نگهداری شد، سپس ۱ میلی لیتر آب یخ به لوله‌ها اضافه شد. کلیه لوله‌ها در ۳۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. در پایان مایع رویی مکیده شد به طوری که بیش از  $0/3$  میلی لیتر در ته لوله باقی نماند.

**ب)  $T_4$ :** به میزان ۲۰ میکرولیتر نمونه پلازما به داخل لوله‌های پوشش دار شده با آنتی بادی ریخته شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر ترپسر اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد همراه با حرکت مداوم انکوباسیون شد. در پایان مایع رویی تخلیه گردید.

**ج)  $T_3$ :** به میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه پلازما به داخل لوله‌های پوشش دار شده با آنتی بادی ریخته شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر ترپسر اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد همراه با حرکت مداوم انکوباسیون شد. در پایان مایع رویی تخلیه گردید.

برای اندازه‌گیری تشعشعات رسوب حاصله در نمونه‌ها از دستگاه گاما کانتور استفاده شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از تعیین وزن، امتیاز وضعیت بدن و غلظت پلاسمایی هورمونهای لپتین و تیروئیدی با استفاده از طرح اندازه‌گیری‌های مکرر و به روش مدل خطی عمومی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفت. جهت تعیین نحوه ارتباط خطی میان فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، از روش تابعیت یک متغیره استفاده شد. نرم افزار آماری مورد استفاده SPSS-9 بود.

## نتایج

**آزمایش اول:** سطح انرژی مصرفی، زمان و اثر متقابل آنها دارای اثر معنی دار ( $p < 0/01$ ) بر وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن بود. در گروه تیمار، میانگین وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن در طی زمان و از روز ۱۵ تا انتهای دوره



جدول ۲- میانگین  $\pm$  (خطای معیار) وزن، امتیاز وضعیت بدن، غلظت هورمونهای تیروکسین، تری یدو تیرونین و لپتین (ng/ml) در میش های که ۶۰ درصد (تیمار) یا ۱۰۰ درصد (شاهد) انرژی نگهداری دریافت کرده بودند در روزهای مختلف آزمایش اول. میانگین های هر صفت که دارای حرف انگلیسی (abc) مشترک نیستند، دارای اختلاف معنی دارند ( $p < 0.05$ ).

روز	وزن		امتیاز وضعیت بدن		تیروکسین		تری یدو تیرونین		لپتین	
	شاهد (۱۰۰٪ انرژی)	تیمار (۶۰٪ انرژی)	شاهد (۱۰۰٪ انرژی)	تیمار (۶۰٪ انرژی)	شاهد (۱۰۰٪ انرژی)	تیمار (۶۰٪ انرژی)	شاهد (۱۰۰٪ انرژی)	تیمار (۶۰٪ انرژی)	شاهد (۱۰۰٪ انرژی)	تیمار (۶۰٪ انرژی)
۱	۴۵/۱۸ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۶۰	۴۵/۱۴ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۶۸	۲/۹۵ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۱۱	۲/۹۱ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۱۱	۵۳/۲۱ <sup>abc</sup> $\pm$ ۳/۸۸	۵۰/۰۱ <sup>c</sup> $\pm$ ۱/۳۴	۰/۸۸ <sup>abcd</sup> $\pm$ ۰/۱۳	۰/۸۵ <sup>abcd</sup> $\pm$ ۰/۰۹	۳/۸۷ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۲۲	۳/۶۴ <sup>ab</sup> $\pm$ ۰/۳۴
۱۵	۴۶/۲۵ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۷۴	۴۱/۶۴ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۷۲	۲/۹۱ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۱۰	۲/۳۰ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۱۰	۶۳/۱۱ <sup>abc</sup> $\pm$ ۴/۱۸	۶۳/۴۳ <sup>ab</sup> $\pm$ ۲/۸۹	۰/۹۴ <sup>abcd</sup> $\pm$ ۰/۱۰	۱/۰۴ <sup>abc</sup> $\pm$ ۰/۱۹	۳/۵۳ <sup>ab</sup> $\pm$ ۰/۲۰	۳/۱۵ <sup>ab</sup> $\pm$ ۰/۱۷
۲۹	۴۵/۲۹ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۵۹	۴۱/۳۱ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۸۹	۲/۹۸ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۶	۲/۱۵ <sup>b</sup> $\pm$ ۰/۰۹	۵۷/۰۳ <sup>abc</sup> $\pm$ ۲/۲۵	۵۱/۰۳ <sup>bc</sup> $\pm$ ۳/۸۹	۱/۱۳ <sup>ab</sup> $\pm$ ۰/۱۵	۰/۸۱ <sup>bcd</sup> $\pm$ ۰/۰۹	۴/۰۳ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۷	۲/۸۷ <sup>bc</sup> $\pm$ ۰/۲۲
۴۳	۴۵/۵۰ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۶۶	۳۹/۷۳ <sup>bc</sup> $\pm$ ۰/۹۷	۲/۹۶ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۸	۱/۷۵ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۰۶	۶۵/۹۳ <sup>a</sup> $\pm$ ۲/۷۸	۳۶/۰۵ <sup>d</sup> $\pm$ ۴/۰۸	۱/۲۳ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۷	۰/۶۶ <sup>cd</sup> $\pm$ ۰/۰۹	۳/۳۳ <sup>ab</sup> $\pm$ ۰/۲۵	۲/۲۱ <sup>cd</sup> $\pm$ ۰/۴۰
۵۷	۴۴/۸۳ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۵۷	۳۷/۹۶ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۷۵	۳/۰۰ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۱۲	۱/۲۵ <sup>d</sup> $\pm$ ۰/۰۶	۵۷/۷۵ <sup>abc</sup> $\pm$ ۱/۷۵	۲۴/۶۶ <sup>d</sup> $\pm$ ۷/۰۷	۱/۰۷ <sup>ab</sup> $\pm$ ۰/۱۲	۰/۶۴ <sup>d</sup> $\pm$ ۰/۰۸	۳/۸۹ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۳۱	۱/۹۷ <sup>d</sup> $\pm$ ۰/۲۲
۷۱	۴۵/۰۷ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۶۵	۳۵/۳۱ <sup>d</sup> $\pm$ ۰/۶۲	۲/۹۸ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۷	۱/۰۴ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۰۴	۶۴/۹۴ <sup>ab</sup> $\pm$ ۷/۹۹	۳۱/۰۷ <sup>d</sup> $\pm$ ۳/۴۴	۱/۰۸ <sup>ab</sup> $\pm$ ۰/۱۷	۰/۱۳ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۰۲	۳/۷۱ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۳۹	۱/۱۶ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۵۳

در آزمایش حاضر نیز غلظت  $T_3$  پلاسما با وجود عدم تغییر در غلظت  $T_4$  در انتهای آزمایش مجدداً به محدودیت غذایی واکنش نشان داده و به شدت کاهش یافته است. بلوم و کونز در سال ۱۹۸۱، علت کاهش غلظت هورمونهای تیروئیدی را پس از کاهش سطح خوراک، تبدیل بیشتر  $T_4$  به  $T_3$  و افزایش تبدیل  $T_3$  و  $T_4$  به متابولیت های غیر فعال می دانند (۳). روند کاهش  $T_3$  همراه با  $T_4$  در اوایل و اواسط دوره محدودیت انرژی در این مطالعه مشابه بود. این امر می تواند به دلایل مطرح شده و همچنین کاهش ترشح هورمونهای فوق از غده تیروئید باشد. اما در اوایل دوره آزمایش به نظر می رسد، با سخت تر شدن شرایط متابولیکی، محور TRH-TSH-Thyroid بیشتر تحت تأثیر قرار گرفته و در نتیجه، دلیل اصلی کاهش غلظت هورمونهای  $T_3$  و  $T_4$ ، کاهش ترشح هورمونهای محرک تیروئیدی بوده است. همچنین با توجه به نقش اصلی  $T_3$  در مقایسه با  $T_4$  در اعمال اثرات هورمونهای تیروئیدی بر بافتها (۱۴)، کاهش تبدیل  $T_4$  به  $T_3$  و یا تبدیل  $T_3$  به متابولیت های غیر فعال نیز ممکن است، در کاهش بیشتر غلظت  $T_3$  در اوایل دوره محدودیت انرژی مؤثر باشد. در هر حال با توجه به نقش اساسی هورمونهای تیروئیدی در متابولیسم پایه، کاهش سطح این هورمونها در میش های تحت محدودیت انرژی، نشانه کاهش میزان متابولیسم در چنین شرایطی می باشد.

نتایج حاصل از تعیین تابعیت خطی بین غلظت پلاسمایی  $T_3$  و  $T_4$  با وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن نشانگر همبستگی مثبت بین تغییرات غلظت پلاسمایی هورمونهای تیروئیدی با وزن و امتیاز وضعیت بدن در گوسفندان دنبه دار است. همچنین همبستگی بین غلظت هورمونهای  $T_3$  و  $T_4$  با غلظت پلاسمایی لپتین بالا و به ترتیب در حدود  $+0.65$  و  $+0.67$  بدست آمد، که با توجه به نقش یکسان هورمونهای تیروئیدی و لپتین در متابولیسم پایه (۱۹)، تغییرات یکسان این هورمونها در خون قابل انتظار بود. در هر حال، نتایج حاصله از آزمایش حاضر، اولین گزارش از نحوه ارتباط خطی بین غلظت هورمونهای تیروئیدی پلاسما با وزن، امتیاز وضعیت بدن و غلظت لپتین خون در میش های شال می باشد.

در آزمایش دوم، تزریق  $1 \mu\text{g/kg BW}$  و  $4 \mu\text{g/kg BW}$  لپتین به میش هایی که پس از یک دوره محدودیت طولانی مدت در انرژی مصرفی با کاهش سطح

هورمون  $T_3$  پلاسما در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق به طور معنی دار نسبت به زمانهای قبل از تزریق مربوطه و یک روز پس از آخرین تزریق (روز پنجم) بالاتر بود. میانگین غلظت این هورمون در گروهی که  $4 \mu\text{g/kg BW}$  به جای  $1 \mu\text{g/kg BW}$  لپتین دریافت کرده، در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق، به طور معنی داری ( $p < 0.01$ ) بیشتر از گروه دیگر بود (جدول ۲).

## بحث

در آزمایش نخست، کاهش سطح انرژی مصرفی در گروه تحت محدودیت انرژی موجب کاهش وزن و امتیاز وضعیت بدن میش ها شد، ولی در گروه شاهد که جیره ای حاوی احتیاجات غذایی در حد نگهداری دریافت کرده بودند، تغییرات معنی دار مشاهده نشد. تغییرات وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن دارای روند هماهنگ بود و با سایر تحقیقات مشابهت دارد (۱۳، ۲۳). مشخص شده است که کاسته شدن از وزن بدن، عمدتاً ناشی از کاهش ذخایر چربی بدن است (۲۲، ۲۳). گرچه تغییرات ذخایر چربی بدن در این آزمایش مستقیماً اندازه گیری نشد، ولی به دلیل بالا بودن ضریب همبستگی میان امتیاز وضعیت بدن و مقدار کل چربی بدن (۲۱)، کاهش امتیاز وضعیت بدن به طور عمده ناشی از کاهش مقدار چربی بدن به نظر می رسد.

در آزمایش اول کاهش سطح انرژی مصرفی در طی زمان در گروه تحت محدودیت انرژی موجب کاهش غلظت هورمون لپتین پلاسما همزمان با کاهش وزن و امتیاز وضعیت بدن میش ها شد. این نتایج مشابه با مطالعات پیشین بر روی میش (۴) و گاو (۶) می باشد.

غلظت پلاسمایی هورمونهای تیروئیدی ( $T_3$  و  $T_4$ ) پس از یک و نیم ماه (در روز ۴۳ آزمایش) از آغاز محدودیت انرژی کاهش یافت و پس از آن تا انتهای دوره آزمایش غلظت  $T_4$  پلاسما تغییراتی نشان نداد. اما غلظت  $T_3$  پلاسما در اوایل دوره آزمایش مجدداً و به شدت تقلیل یافت. در مطالعات پیشین کاهش سطح انرژی مصرفی در نشخوارکنندگان موجب کاهش ترشح و غلظت پلاسمایی  $T_3$  و  $T_4$  شده است (۲۶، ۲۷). برخی پژوهش ها نیز نشان می دهد،  $T_3$  نسبت به  $T_4$  در پاسخ به تغییرات تغذیه حساستر است (۲۴، ۱۸).



جدول ۳- تغییرات غلظت هورمونهای تیروکسین، تری یدو تیروئین و لپتین (ng/ml) در میش‌هایی که به ترتیب ۱ یا ۴ میکروگرم لپتین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. (قبل از تزریق)، (بعد از تزریق). میانگین‌های هر صفت که دارای حرف انگلیسی (abc) مشترک نیستند، دارای اختلاف معنی‌دارند ( $p < 0.05$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  (خطای معیار) نمایش داده شده‌اند.

روز	تیروکسین	تیروکسین	تری یدو تیروئین	تیروکسین	تیروکسین	لپتین
۰	باتزریق ۱µg/Kg BW لپتین	باتزریق ۴µg/Kg BW لپتین	تری یدو تیروئین	باتزریق ۱µg/Kg BW لپتین	باتزریق ۴µg/Kg BW لپتین	لپتین
۰	۳۴/۰۰ <sup>ab</sup> $\pm$ ۱/۲۸	۳۹/۶۴ <sup>abc</sup> $\pm$ ۴/۴۸	۰/۳۴ <sup>abc</sup> $\pm$ ۰/۰۸	۰/۳۴ <sup>abc</sup> $\pm$ ۰/۰۸	۰/۳۴ <sup>abc</sup> $\pm$ ۰/۰۸	۰/۸۳ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۵
۲-۳ق	۳۷/۹۸ <sup>abc</sup> $\pm$ ۲/۹۸	۳۴/۱۹ <sup>ab</sup> $\pm$ ۳/۰۴	۰/۵۱ <sup>abcde</sup> $\pm$ ۰/۰۷	۰/۵۱ <sup>abcde</sup> $\pm$ ۰/۰۷	۰/۲۳ <sup>ab</sup> $\pm$ ۰/۰۴	۰/۸۳ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۵
۲-ب	۴۹/۵۰ <sup>cd</sup> $\pm$ ۱/۰۴	۹۴/۷۸ <sup>f</sup> $\pm$ ۸/۰۰	۰/۷۸ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۰۶	۰/۷۸ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۰۶	۱/۴۸ <sup>f</sup> $\pm$ ۰/۳۰	۲/۴۱ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۰۷
۴-ق	۴۰/۶۵ <sup>abc</sup> $\pm$ ۷/۰۱	۴۵/۸۴ <sup>bc</sup> $\pm$ ۳/۶۰	۰/۵۵ <sup>bcd</sup> $\pm$ ۰/۰۵	۰/۵۵ <sup>bcd</sup> $\pm$ ۰/۰۵	۰/۵۲ <sup>abcde</sup> $\pm$ ۰/۰۶	۰/۸۸ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۵
۴-ب	۶۱/۴۰ <sup>d</sup> $\pm$ ۳/۸۲	۸۱/۴۷ <sup>c</sup> $\pm$ ۱/۶۴	۰/۷۶ <sup>bc</sup> $\pm$ ۰/۰۶	۰/۷۶ <sup>bc</sup> $\pm$ ۰/۰۶	۱/۵۹ <sup>f</sup> $\pm$ ۰/۰۸	۲/۴۳ <sup>c</sup> $\pm$ ۰/۰۴
۵	۳۸/۹۳ <sup>abc</sup> $\pm$ ۳/۵۴	۴۰/۵۷ <sup>abc</sup> $\pm$ ۱/۶۴	۰/۴۸ <sup>abcd</sup> $\pm$ ۰/۰۴	۰/۴۸ <sup>abcd</sup> $\pm$ ۰/۰۴	۰/۵۲ <sup>bcd</sup> $\pm$ ۰/۱۲	۰/۸۶ <sup>a</sup> $\pm$ ۰/۰۶

تیروئیدی است، به طوری که هر چه دز تزریق لپتین بیشتر باشد، ترشح و غلظت هورمونهای  $T_3$  و  $T_4$  افزایش می‌یابد.

هورمونهای  $T_3$  و  $T_4$  مواجه بودند، منجر به افزایش غلظت این هورمون‌ها شد. غلظت هورمونهای  $T_3$  و  $T_4$  به مقدار تزریق لپتین واکنش نشان داد، به طوری که در گروهی که  $4 \mu\text{g/kg BW}$  لپتین دریافت کرده‌اند، غلظت هورمونهای تیروئیدی احتمالاً به دلیل افزایش ترشح این هورمون‌ها بیشتر از گروهی بود که مقدار  $1 \mu\text{g/kg BW}$  لپتین دریافت کردند. علت این امر می‌تواند تحریک گیرنده‌های بیشتری از لپتین بر روی محور TRH - TSH-Thyroid و یا افزایش سنتز یا تسریع در باز یافت این گیرنده‌ها در مقادیر بالاتر تزریق بوده باشد.

نتایج مطالعه حاضر اولین گزارش از اثر محرک لپتین بر ترشح هورمونهای تیروئیدی در نشخوارکنندگان بوده و نشان می‌دهد که تزریق لپتین قادر به تقلیل اثر کاهنده محدودیت انرژی بر ترشح هورمونهای تیروئیدی در میش می‌باشد و همچنین تأیید کننده نتایج آزمایش‌های قبلی بر روی غیرنشخوار کنندگان است. به طور مثال در مطالعات پیشین مشاهده شده است، تزریق هورمون لپتین به صورت ICV در موش‌های گرسنه از کاهش سطح هورمونهای  $T_3$  و  $T_4$  (۲) و کاهش ساخت پیش مولکول TRH (۱۶) جلوگیری به عمل می‌آورد. در یک آزمایش نیز مشخص شد، لپتین به طور همزمان موجب افزایش آزادسازی TSH و  $T_4$  می‌گردد (۹). نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تأثیر لپتین بر ترشح هورمونهای تیروئیدی می‌تواند از طریق هورمونهای TRH یا TSH اعمال شود. هر چند برای شناسایی سازوکار دقیق تأثیر لپتین بر محور TRH - TSH-Thyroid نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد. افزایش ترشح هورمونهای تیروئیدی موجب افزایش متابولیسم پایه و دفع بیشتر انرژی از بدن می‌شود (۱۴). بنابراین، با توجه به اثرات ترموژنیک (۵، ۱۵، ۱۹، ۲۰) و لیپولیتیک (۱۰، ۱۱) هورمون لپتین، به نظر می‌رسد حداقل بخشی از این اثرات از طریق افزایش ترشح هورمونهای تیروئیدی اعمال می‌گردد.

به طور کلی از نتایج این آزمایش چنین استنباط می‌شود که محدودیت طولانی مدت انرژی و برقراری توازن منفی انرژی در میش‌های دنبه‌دار موجب کاهش غلظت هورمونهای  $T_3$  و  $T_4$  و در نتیجه کاهش میزان متابولیسم پایه می‌گردد. در چنین شرایطی تزریق لپتین می‌تواند اثرات بازدارنده توازن منفی انرژی را بر ترشح هورمونهای تیروئیدی کم نماید. ضمن آنکه لپتین دارای اثر محرک وابسته به دز بر ترشح هورمونهای

## References

1. AFRC.(1995) Agricultural and Food Research Council, energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. 2<sup>nd</sup> Ed. CAB International, Wallingford, U.K.
2. Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. and Flier, J.S.(1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature. 382: 250-252.
3. Blum, J.W., Kunz, P.(1981) Effects of fasting on thyroid hormone levels and kinetics of reverse triiodothyronine in cattle. Acta Endocrinol. 98: 234-240.
4. Bocquier, F., Bonnet, M., Faulconnier, Y., Guerremillo, M., Martin, P. and Chilliard, Y.(1998) Effect of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. Reprod. Nut. Develop. 38: 484-498.
5. Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R. and Burn, P.(1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Sci. 269: 546-549.
6. Chilliard, Y., Bocquier, F., Delavaud, C., Guerremillo, M., Bonnet, M., Martin, P., Faulconnier, Y. and Ferlay, A.(1998) Leptin in ruminants: Effects of species, breed, adiposity, photoperiod, beta-agonists and nutritional status. Proceeding of Cornell



- Nutrition Conference for Feed Manufacturers USA, 65-75.
7. Chilliard, Y., Bocquier, F., Doreau, M.(1998) Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod. Nut. Develop.* 38: 131-152.
  8. Christensen, R.A., Malinowski, K., Massenzio, A.M., Hafs, H.D. and Scanes, C.G.(1997) Acute effects of short-term feed deprivation and refeeding on circulating concentrations of metabolites, Insulin-like growth factor, Insulin-like growth factor-binding protein, somatotropin and thyroid hormones in adult geldings. *J. Anim. Sci.* 75: 1351-1358.
  9. Flier, J.S., Maratos-Flier, E.(1998) Obesity and the hypothalamus, Novel peptides for new pathways. *Cell.* 92: 437-440.
  10. Fruhbeck, G., Agnado, M., Gomez-Ambrosi, J. and Martinez, J.A.(1998) Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 260: 99-102.
  11. Fruhbeck, G., Agnado, M., Martinez, J.A.(1997) In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: Evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 240: 590-594.
  12. Glade, M.J., Reimers, T.J.(1985) Effects of dietary energy supply on serum thyroxine, triiodothyronine, and insulin concentrations in young horses. *J. Endocrinol.* 104: 93-100.
  13. Gutierrez, J., Dunn, T.G, Moss, G.E.(1987) Inanition decreases episodic LH release in ovariectomized ewes. *J. Anim. Sci.* 65(suppl. 1): 406.
  14. Guyton, A.C., Hall, J.E.(1996) *Textbook of Medical Physiology.* 9th edn. W.B. Saunders Company, USA.
  15. Halaas, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A. and Freidman, J.M.(1997) Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8878-8883.
  16. Legradi, G., Emerson, C.H., Ahima, R.S., Flier, J.S. and Lechan, R.M.(1997) Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinol.* 138: 2569-2576.
  17. Loucks, A.B., Verdun, M.(1998) Slow restoration of LH pulsatility by refeeding in energetically disrupted women. *Am. J. Physiol.* 275: R1218-R1226.
  18. Messer, N.T., Johnson, P.J., Refsal, K.R., Nachreiner, R.F., Ganjman, V.K. and Krause, G.F.(1995) Effect of food deprivation on baseline triiodothyronine and cortisol concentrations in healthy adult horses. *Am. J. Vet. Res.* 56: 116-122.
  19. Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. and Collins, E.(1995) Effects of obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Sci.* 269: 540-543.
  20. Rouru, J., Cusin, I., Zakrzewska, K.E., Jeanrenaud, B. and Rohner-Jeanrenaud, F.(1999) Effects of intravenously infused leptin on insulin sensitivity and on the expression of uncoupling proteins in brown and adipose tissue. *Endocrinol.* 140: 3688-3692.
  21. Sanson, D.W., West, T.R. and Tatman, W.R.(1993) Relationship of body composition of mature ewes with condition score and body weight. *J. Anim. Sci.* 71: 1112-1116.
  22. Schillo, K.K.(1992) Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70: 1271-1282.
  23. Tatman, W.R., Judkins, M.B., Dunn, T.G. and Moss, G.E.(1990) Luteinizing hormone in nutrient-restricted ovariectomized ewes. *J. Anim. Sci.* 68: 1097-1102.
  24. Teleni, E., King, W.R., Rowe, J.B. and McDowell, G.H.(1989) Lupins and energy-yielding nutrients in ewes. I. Glucose and acetate biokinetics and metabolic hormones in sheep fed a supplement of lupin grain. *Aust. J. Agri. Sci.* 40: 913-924.
  25. White, F.J., Lents, C.A., Floyd, L.N., Spicer, L.J. and Wettmann, R.P.(2000) Acute nutritional restriction alters endocrine function and causes anovulation in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 87(suppl. 1): 933.
  26. Wynn, P.C., Reis, P.J., Fleck, E., Ward, W., Tunks, D.A. and Munro, S.G.(1988) The influence of protein and energy supply on ovine metabolic hormone status. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia.* 13: 125.

